

Äther entzogen, die Thiazolbase durch Zusatz konzentrierter Natronlauge unter Eiskühlung freigesetzt, mit Äther extrahiert und schliesslich im Hochvakuum destilliert. Unter 0,003 mm Druck ging das 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol konstant bei 92–94° über.

Aus den Mutterlaugen der Pikratfällung wurden nach vollständiger Abtrennung des Pikrats sowie überschüssiger Pikrinsäure durch längere Extraktion der neutralisierten Lösung mit Äther 2,8 g eines viskosen, braunen Öles gewonnen. Bei der Destillation im Hochvakuum ging dieses bei einem Druck von 0,002–0,003 mm zwischen 88° und 92° (Luftbadtemperatur, Destillation aus einer Kugelröhre) als klare, leicht hellgelb gefärbte Flüssigkeit über. Diese Verbindung ist das weiter oben beschriebene 4-Methyl-5-oxyäthyl-2-chlorthiazol. Es ist in Wasser schwer, in Alkohol, Äther und Pyridin sowie auch in verdünntem wässrigem Alkohol leicht löslich.

Zürich, Chemisches Institut der Universität  
und Bern, Hallerianum.

## 162. Recherches sur l'amidon XXV.

### Le glycogène du muscle natif

par Kurt H. Meyer et R. Jeanloz.

(22 VII 43)

L'étude du *glycogène natif* a constitué le sujet de ce travail. Ce problème comprend 1° la *recherche de l'état du glycogène* dans l'organisme vivant: se trouve-t-il dans la cellule à l'état libre ou lié à des protéines? 2° La *préparation* du glycogène d'une manière ménagée, condition essentielle dans pareille recherche: aucune liaison chimique ne doit être scindée; et enfin 3° l'*étude du glycogène* ainsi obtenu.

Nous avons choisi comme matériel de départ les moules *Anodonta* qui sont riches en glycogène de muscle après avoir été nourries à la semoule.

#### 1. *Etat du glycogène dans la cellule.*

Au cours de ses nombreux travaux, *Pflüger*<sup>1)</sup> a nié l'existence d'une liaison du glycogène à d'autres constituants de la cellule. Par contre, *Willstätter* et *Rohdewald*<sup>2)</sup> ont déduit, de leurs essais d'extraction du glycogène de foie avec de l'eau chaude ou de l'acide trichloracétique dilué, qu'une partie se trouvait sous forme libre et soluble, le *lyoglycogène*, et que le reste était sous forme insoluble de « symplexe » avec des protéines: le *desmoglycogène*.

<sup>1)</sup> *E. Pflüger*, Das Glykogen, Bonn 1905 (2ème édit.), pp. 33 et 45.

<sup>2)</sup> *R. Willstätter* et *M. Rohdewald*, Z. physiol. Ch. **225**, 103 (1934).

Les recherches de *Willstätter* et *Rohdewald* montrent effectivement que seule une partie du glycogène est extraite par l'eau bouillante, et que son importance varie avec la nourriture absorbée. Les foies riches en glycogène contiennent relativement plus de « lyoglycogène ». Nous trouvons également que dans le muscle d'anodonte une partie du glycogène peut être extraite à l'eau chaude. L'autre partie reste tout d'abord insoluble avec des protéines coagulées. Cette fraction peut être ensuite solubilisée par traitement à l'hydrate de chloral en solution aqueuse concentrée, ou par une solution de chlorure de calcium à 40 %. Ces deux dissolvants n'hydrolysent pas les protéines et ne scindent pas les liaisons chimiques entre l'hydrate de carbone et la protéine.

Toutefois, cette fraction du glycogène demeure insoluble dans l'eau, malgré sa séparation des protéines: elle donne dans ce dissolvant une suspension qui peut être centrifugée ou qui se dépose lors de l'électrodialyse, sans que du glycogène entre en solution. Par conséquent, l'insolubilité de ce glycogène ne dépend pas d'une liaison avec les protéines, mais est une propriété inhérente au glycogène lui-même. Comme nous allons le montrer plus loin, le *glycogène se compose de parties solubles et insolubles dans l'eau*, qui se différencient surtout par leur poids moléculaire. Il semble que la proportion en glycogène soluble augmente avec la teneur en glycogène total: nous interprétons ainsi les résultats de *Willstätter* et *Rohdewald*.

Afin d'élucider la composition du glycogène lui-même, nous l'avons préparé en évitant toute dégradation, nous l'avons fractionné et avons étudié ses fractions. La méthode d'extraction à l'alcali fort, élaborée par *Claude Bernard*<sup>1)</sup> et perfectionnée par *Pflüger*<sup>2)</sup>, ne pouvait pas être prise en considération, car les liaisons éventuelles du glycogène avec des restes de protéines ou d'acides pouvaient être scindées. En outre, les hydrates de carbone subissent facilement une dégradation oxydative en solution alcaline. Des traces d'oxygène suffisent pour dégrader la très grande molécule de glycogène (par exemple il suffit de  $5 \times 10^{-6}$  gr. O<sub>2</sub> pour dégrader de moitié 1 gr. de glycogène de poids moléculaire de  $3 \times 10^6$ ).

## 2. *Extraction fractionnée.*

La majeure partie du glycogène d'anodontes bien nourries est extraite par l'eau chaude. Le glycogène précipité par le méthanol contenait 85 % de glycogène pur et des protéines. La plus grande partie de celles-ci peut être éliminée après dissolution par précipitation avec l'acide picrique; cette méthode a déjà été employée par *Young*<sup>3)</sup> et par *Petree* et *Alsberg*<sup>4)</sup>. Avant de procéder à une purifica-

1) Leçons sur la Physiologie et la Pathologie du Système nerveux, t. 1, p. 467.

2) l. c.      3) *F. G. Young*, *Biochem. J.* **31**, 711 (1937).

4) *L. G. Petree* et *C. L. Alsberg*, *J. Biol. Chem.* **82**, 385 (1929).

tion ultérieure, nous avons préparé plusieurs fractions par électrodialyse: une partie soluble et limpide (fraction I), une partie trouble, formant la couche inférieure de la liqueur électrodialysée (fraction II) et une partie qui se dépose sous forme de particules gonflées (fraction III). Les fractions I et II peuvent être débarassées des protéines par agitation avec le chloroforme selon la méthode de *Sevag*<sup>1)</sup> déjà employée par *Stockhausen* et *Silbereisen*<sup>2)</sup> pour le glycogène de la levure. La fraction III ne peut être purifiée de cette façon, car elle donne une suspension qui se dépose rapidement. On la dissout dans une solution de chlorure de calcium à 40 % et la précipite avec l'iode sous forme d'une combinaison d'addition brune, exempte de protéines, dont le glycogène peut être facilement régénéré.

La bouillie de muscle extraite à l'eau chaude contient encore du glycogène qui peut être solubilisé en même temps qu'une certaine quantité de protéines par chauffage dans une solution d'hydrate de chloral à 33 %. On le purifie également par l'intermédiaire de son composé d'addition avec l'iode (fraction IV).

Nous avons obtenu 20 gr. de glycogène à partir de 20 moules, dont la chair pesait 760 gr. La totalité du glycogène se composait approximativement de

Fraction I	4,4 gr. hydrosoluble
II	9,5 gr. mélange de 0,5 gr. soluble et 9 gr. insoluble en suspension
» III	3,2 gr. insoluble
» IV	0,8 gr. insoluble

Le glycogène étudié contient donc environ 30 % de glycogène soluble et 70 % d'insoluble.

Même après une purification complète, la majeure partie des fractions III et IV conserve son insolubilité dans l'eau. On peut centrifuger facilement le glycogène des suspensions obtenues en le triturant dans l'eau; la liqueur surnageante est dépourvue de glycogène.

Le glycogène peut même être traité par la potasse caustique à 100°, méthode utilisée pour le dosage selon *Pflüger*, sans que ses propriétés soient modifiées. En effet, le glycogène préparé d'après la méthode à l'alcali se compose également de glycogène soluble et insoluble.

La présence de glycogène insoluble dans l'eau, en proportion relativement forte, semble être en contradiction avec les observations des histologues: le glycogène des coupes microscopiques peut être entièrement extrait par l'eau. Notre opinion à ce sujet est qu'il s'agit en partie d'une solution et en grande partie d'un entraînement.

Toutes les fractions étaient dépourvues de phosphore. Il faut mentionner à ce propos que *Samec* et *Jsajevic*<sup>3)</sup> ont étudié un glyco-

<sup>1)</sup> *M. Sevag*, *Bioch. Z.* **273**, 419 (1934).

<sup>2)</sup> *F. Stockhausen* et *K. Silbereisen*, *Bioch. Z.* **287**, 276 (1936).

<sup>3)</sup> *M. Samec* et *V. Jsajevic*, *C. r.* **176**, 1419 (1923).

gène de foie de chien dont les 80 % étaient solubles dans l'eau et que cette partie possédait une teneur en phosphore de 0,7 %, alors que *Reich*<sup>1)</sup> dans le glycogène du commerce et *Taylor et McBride*<sup>2)</sup> dans le glycogène du foie de rat ne trouvent pas de phosphore.

Par des méthodes n'attaquant pas les liaisons chimiques, la teneur en azote a pu être abaissée à 0,07 %, ce qui prouve qu'aucun reste contenant de l'azote est lié chimiquement avec le glycogène.

### 3. Le poids moléculaire du glycogène.

Plusieurs auteurs ont effectué des mesures de pression osmotique.

L'insolubilité de la majeure partie du glycogène dans l'eau empêche les mesures dans ce dissolvant. L'addition d'alcalis ou de sels (chlorures de sodium ou de calcium) à la solution aqueuse donne des résultats discordants. Ainsi *Oakley et Young*<sup>3)</sup> obtiennent dans l'osmomètre à basse pression de *Oakley* des poids moléculaires pour un glycogène de foie de lapin d'environ 700 000 dans l'eau et de 2 000 000 en solution saline; les auteurs concluent à la présence d'ions dans le glycogène qui, par effet *Donnan* en solution aqueuse, donnerait des valeurs trop fortes pour la pression osmotique. Il est fort probable que ce glycogène forme dans l'eau des associations micellaires dont la grandeur est augmentée par le sel inorganique (effet de salage).

D'autres mesures effectuées sur les dérivés méthylés du glycogène par *Oakley et Young* (l. c.) donnent un poids moléculaire de 3 500 000; toutefois l'emploi de benzène comme dissolvant peut permettre une certaine association des molécules à groupe polaire (comme  $-OCH_3$ ).

Nous avons travaillé sur les dérivés acétylés du glycogène, en solution d'alcool benzylique. En effet, il est possible de préparer facilement les dérivés acétylés, sans qu'il y ait la moindre dégradation (voir *Staudinger et Husemann*<sup>4)</sup>), alors que les dérivés méthylés risquent de subir des transformations dans le milieu alcalin où ils sont préparés. Ainsi *Carter et Record*<sup>5)</sup> trouvent des poids moléculaires de 273 000 à 830 000 pour une série de glycogènes méthylés et de  $1,9$  à  $3,5 \times 10^6$  pour la même série acétylée.

L'acétylation a été effectuée sur des produits formant une fine dispersion après dissolution préalable dans une solution d'hydrate de chloral et précipitation par l'alcool, au moyen de l'anhydride acétique dans la pyridine, sous les conditions habituelles. Elle a eu lieu avec des difficultés croissant avec l'ordre d'insolubilité des fractions.

1) *W. S. Reich*, C. r. **194**, 2141 (1932).

2) *T. C. Taylor et J. H. McBride*, Am. Soc. **53**, 3437 (1931).

3) *H. B. Oakley et F. G. Young*, Biochem. J. **30**, 868 (1936).

4) *H. Staudinger et E. Husemann*, A. **530**, 1 (1937).

5) *S. R. Carter et B. R. Record*, Soc. **1937**, 577.

L'emploi de l'alcool benzylique comme dissolvant nous a été dicté par le fait qu'il contient des groupes polaires et apolaires et qu'il peut ainsi solvatiser les groupes des deux genres et empêcher la formation de micelles.

Nous avons trouvé un poids moléculaire minimum de  $6 \times 10^6$ . Il est impossible de préciser davantage cette valeur à cause de la présence éventuelle d'impuretés, qui, par suite de leur poids moléculaire relativement faible, peuvent avoir une influence très grande sur la pression osmotique, même en concentration très basse.

*Le glycogène du muscle est donc constitué de molécules dont les plus petites possèdent un poids moléculaire supérieur à  $6 \times 10^6$ .*

#### 4. La viscosité et la forme de la molécule.

Les viscosités des acétates de glycogène que nous avons mesurées sont très faibles; leurs valeurs de viscosité limite  $\lim/c = 0$  [ $\eta_{\text{spéc.}}/c$ ] sont comprises entre 0,087 et 0,164. Les pentes des courbes sont faibles, puisque  $\eta_{\text{spéc.}}/c$  passe pour la plus rapide de 0,164 ( $c = 0$ ) à 0,222 ( $c = 4 \text{ gr./100 cm}^3$ ). Si nous les comparons à la courbe de l'acétate d'amylopectine et à la courbe de l'acétate d'amylose<sup>1)</sup>, nous concluons à une structure très ramifiée à caractère compact, car à poids moléculaire égal, un corps ramifié possède une plus petite viscosité qu'un corps linéaire<sup>2)</sup>. D'autre part, il faut également tenir compte du poids moléculaire énorme et de la détermination du nombre des groupes terminaux, effectuée par *Haworth, Hirst et Isherwood*<sup>3)</sup> et *K. H. Meyer et Fuld*<sup>4)</sup> qui indiquent une structure très ramifiée.

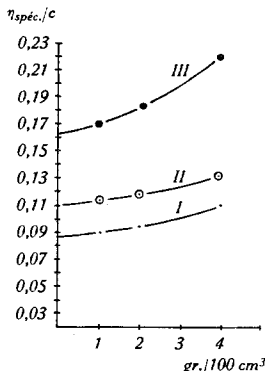


Fig. 1.

Viscosités des triacétats des fractions I, II et III.

<sup>1)</sup> *K. H. Meyer, P. Bernfeld et W. Hohenemser, Helv. 23, 885 (1940).*

<sup>2)</sup> *K. H. Meyer et P. Bernfeld, Helv. 23, 875 (1940).*

<sup>3)</sup> *W. N. Haworth, E. L. Hirst et F. A. Isherwood, Soc. 1937, 577.*

<sup>4)</sup> *K. H. Meyer et M. Fuld, Helv. 24, 375 (1941).*

Le fait que la valeur  $\pi/c$  dans la mesure de la pression osmotique du triacétate de glycogène reste presque constante et très basse est une nouvelle preuve de la forme compacte.

Nous ne pouvons toutefois pas admettre la forme rigoureusement sphérique proposée par *Staudinger* et *Husemann*<sup>1)</sup>, puisque la relation  $\eta_{\text{spéc.}}/c$  n'est pas indépendante de la concentration, comme l'affirme *Staudinger*. En outre, les valeurs lim. (0,087—0,164) de  $\eta_{\text{spéc.}}/c$  dépassent de beaucoup la valeur théorique d'*Einstein* pour des particules sphériques, qui est de 0,025.

### 5. Les dégradations des fractions par la $\beta$ -amylase.

Ainsi que l'ont montré *Ohlsson*<sup>2)</sup>, *Hanes*<sup>3)</sup> et *Samec*<sup>4)</sup>, la  $\beta$ -amylase attaque les chaînes de polysaccharides depuis l'extrémité non aldéhydrique, en libérant du maltose. Les ramifications arrêtent cette dégradation et il reste une « dextrine résiduelle » (*K. H. Meyer* et *Fuld*<sup>5)</sup>).

Nos essais de dégradation par cet enzyme montrent que la fraction I est nettement plus attaquée que les fractions II et III, dont les dégradations sont pratiquement identiques :

	Limite de dégradation
Fraction I . . . . .	43 à 43,5%
Fraction II . . . . .	33 à 34%
Fraction III . . . . .	30 à 32%
Glycogène commercial « <i>Hoffmann-La Roche</i> » . . . . .	46 à 46,5%
Dextrine obtenue par scission avec l'acide chlorhydrique . . . . .	53 à 53,5%
Fraction II traitée par la potasse caustique en présence d'oxygène. . . . .	34 à 35%
Fraction II traitée par la potasse caustique en absence d'oxygène . . . . .	32%

La raison de ces dégradations différentes suivant les fractions est révélée par l'action ménagée de l'acide chlorhydrique. Celle-ci transforme la molécule de glycogène en des fragments, conservant encore le caractère hautement polymérisé; l'attaque enzymatique aboutit à une dégradation de 53 %. Il semble donc que l'enzyme, dont la molécule est volumineuse, ne puisse pas pénétrer dans l'enchevêtrement de la molécule géante de glycogène; ainsi, certaines ramifications seraient protégées. Cette protection est supprimée lorsque par une légère scission les ramifications viennent à découvert.

1) *H. Staudinger* et *E. Husemann*, l. c.

2) *E. Ohlsson*, *Z. physiol. Ch.* **189**, 17 (1930).

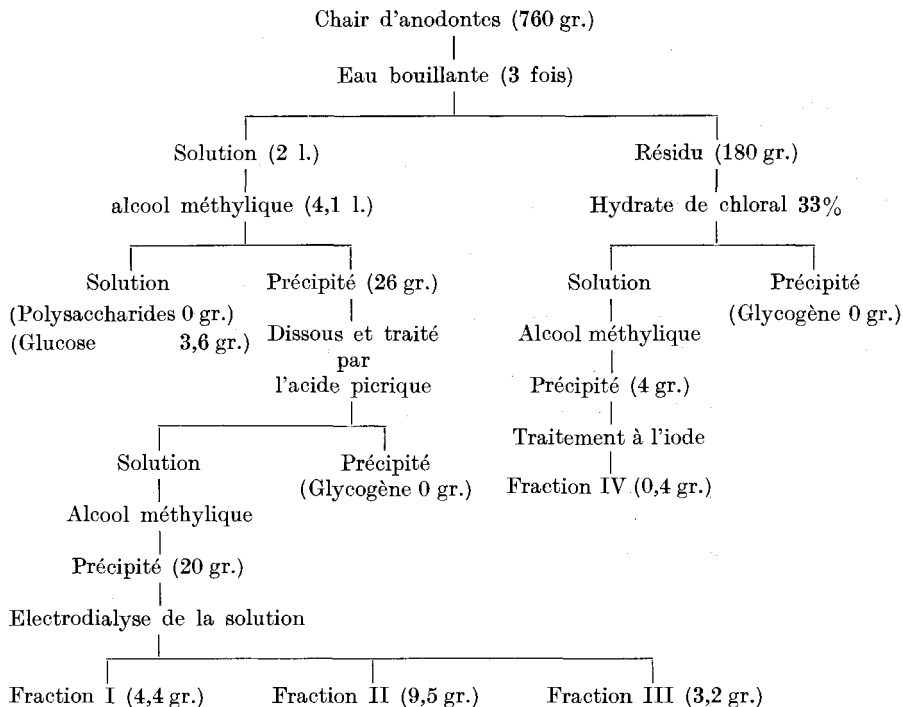
3) *C. S. Hanes*, *New Phytologist* **36**, 538 (1937).

4) *M. Samec*, *Koll.-chem. Beih.* **49**, 101 (1939).

5) *K. H. Meyer* et *M. Fuld*, *Helv.* **24**, 375 (1941).

## Partie expérimentale.

### 1. Schéma d'extraction, de purification et de fractionnement.



### 2. Méthodes analytiques employées.

La teneur en eau varie entre 8 et 10 % pour toutes les fractions. Les résultats des analyses sont donnés par rapport à la substance sèche.

#### a) Glycogène.

La substance est hydrolysée en courant d'azote ou d'anhydride carbonique avec HCl 1-N. La durée d'ébullition est en général de 30 minutes. Pour le glycogène brut, une durée d'ébullition de 8 à 15 heures augmente de 3% l'hydrolyse. Pour les glycogènes purifiés, l'hydrolyse est totale en 30 minutes.

Le glucose formé est dosé selon *Bertrand*.

Lorsque la substance contient en majeure partie des protéines, nous avons employé pour le dosage du glycogène la méthode rapide de *Pflüger*<sup>1)</sup>, en travaillant en creuset de platine et en remplaçant les filtrations par des centrifugations.

#### b) Protéines.

Leur teneur a été déterminée par dosage de l'azote selon *Dumas*. Dans un cas, nous avons dosé l'azote selon *Kjeldahl*.

#### c) Phosphore.

Le dosage est effectué d'après *Fiske et Subbarrow*<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> l. c.

<sup>2)</sup> *J. King, Biochem. J.* **26**, 292 (1932).

### 3. Extraction aqueuse du glycogène brut.

20 anodontes nourries pendant 15 jours à la semoule, pesant 2150 gr., sont déséquées et donnent 760 gr. de chair. Immédiatement après dissection, la chair est jetée dans 1 litre d'eau bouillante et on maintient à l'ébullition pendant une heure. On laisse refroidir et centrifuge. Le résidu est repris 3 fois par 250 cm<sup>3</sup> d'eau bouillante et les liqueurs d'extraction sont réunies et filtrées. La solution (2 litres) est fortement opalescente. Son p<sub>H</sub> est de 6,8. Valeur réductrice à blanc: 1 cm<sup>3</sup> de solution = 6 mgr. de Cu (*Bertrand*), ce qui correspond à 6 gr. de glucose.

Valeur réductrice après hydrolyse: 1 cm<sup>3</sup> de solution: 37 mgr. de Cu (*Bertrand*); elle correspond à 31 gr. de glycogène.

Les 2 litres de solution sont additionnés sous agitation violente de 4,1 litres d'alcool méthylique à 98%. On laisse reposer au froid, décante, puis centrifuge. On sèche par lavage à l'alcool méthylique, puis à l'éther. On redissout dans 2 litres d'eau et recommence la précipitation, lave à l'alcool méthylique absolu, puis 2 fois à l'éther et sèche au dessiccateur à vide. On obtient ainsi 26 gr. de glycogène lié à des protéines.

La solution alcoolique résiduelle contient < 0,006% de phosphore et sa teneur en polysaccharides est nulle; sa teneur en sucres correspond à 3,3 gr. de glucose.

Le précipité est non réducteur et contient 85% de glycogène: 1 cm<sup>3</sup> d'une solution à 15% emploie 4,1 cm<sup>3</sup> de KMnO<sub>4</sub> 0,1-N.

### 4. Elimination des protéines par l'acide picrique.

Le glycogène brut est dissous dans 1,7 litres d'eau distillée. On ajoute à froid sous forte agitation 600 cm<sup>3</sup> d'une solution d'acide picrique à 1,5% et laisse reposer une nuit à la glacière. On centrifuge.

Le précipité est exempt de glycogène (dosage selon *Pflüger*). La solution est additionnée de 4,5 litres d'alcool méthylique. On laisse reposer, décante, puis centrifuge. On lave 3 fois à l'alcool méthylique, puis 3 fois à l'éther. Le produit encore légèrement jaunâtre est extrait 3 jours au *Soxhlet* à l'éther, puis séché au vide, redissout dans un litre d'eau et précipité par 600 cm<sup>3</sup> d'alcool méthylique. On lave 2 fois à l'alcool méthylique, 2 fois à l'éther, sèche et obtient 20 gr. de glycogène.

Le glycogène dispersé dans l'eau donne une solution opalescente contenant des traces d'acide picrique. L'opalescence disparaît par addition de soude caustique.

On n'obtient aucune précipitation avec l'acide tungstique à 10%, l'acide trichloracétique à 10%, l'acide picrique à 1%, l'acide citrique à 2%.

*Analyses*: On purifie par une troisième précipitation à l'alcool méthylique:

Cendres 0,57%.

Phosphore 0,001%.

Teneur en protéines (dosage de l'azote selon *Kjeldahl*) env. 3,5%.

6,06 mgr. subst. emploient 0,255 cm<sup>3</sup> HCl 0,01-N; 0,58% N.

Teneur en glycogène: 94—95%.

### 5. Fractionnement du glycogène brut par électrodialyse.

20 gr. de glycogène brut sont dissous dans 1000 cm<sup>3</sup> d'eau distillée. On les introduit par portions de 350 cm<sup>3</sup> dans un électrodialyseur selon *Pauli*, composé d'un compartiment central cylindrique de 4 cm de longueur fermé par des membranes en cellophane d'environ 100 cm<sup>2</sup> de surface. Les électrodes de platine sont distantes de 0,5 cm des membranes.

L'électrodialyse dure 10 jours, jusqu'à un ampérage de 1,5 mA sous 35 V. L'acide picrique passe dans le compartiment anodique et peut être complètement éliminé. Il se forme un précipité au fond du compartiment central, ainsi que contre la membrane anodique.

Au-dessus du précipité se trouve une couche d'environ 1 cm fortement opalescente et trouble, surmontée d'une solution translucide et faiblement opalescente.



On siphonne ces deux couches et obtient 870 cm<sup>3</sup> de solution translucide (fraction I) et 150 cm<sup>3</sup> d'une suspension (fraction II). Le précipité est désigné sous le nom de fraction III.

Au cours de l'expérience, la fraction II avait visiblement diminué de hauteur et s'était déposée dans la couche III. Du fait de la solubilité de la fraction I, environ 10% de celle-ci est restée mêlée à la fraction II.

Les fractions I et II sont précipitées par addition d'alcool méthylique jusqu'à une concentration de 65% en alcool, sous forte agitation. On lave ensuite à l'alcool méthylique et à l'éther et sèche au dessiccateur; la fraction III est lavée et séchée de même.

Poids obtenus: Fraction I 4,4 gr.  
 » II 9,5 gr.  
 » III 3,2 gr.

#### *Fraction I.*

Produit blanc neigeux. Il se dissout dans l'eau sans trouble en solution diluée (moins de 2%). La solution dans l'hydrate de chloral est opalescente. Elle ne dépose pas après un long repos.

#### *Fraction II.*

Produit blanc neigeux. Il se dissout dans l'eau avec un fort trouble, même en solution très diluée. La solution à 2% dans l'hydrate de chloral est légèrement trouble. La solution aqueuse *dépose* après un repos de 20 jours. Elle ne précipite pas avec le sous-acétate de plomb en solution basique, ni avec la solution aqueuse de tannin.

*Analyses:* On reprécipite le produit avant de les effectuer.

Cendres 0,1%.

Teneur en protéines (dosage de l'azote selon *Dumas*) env. 3%.

65,900 mgr. subst. ont donné 0,2597 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (22°; 731 mm.), 0,43% N.

Teneur en glycogène: 8,14 mgr. subst. emploient 2,60 cm<sup>3</sup> KMnO<sub>4</sub>; 0,1-N: 8,10 mgr. glucose; 98% de glycogène.

#### *Purification par agitation avec le chloroforme.*

0,5 gr. de glycogène fraction II (teneur en azote de 0,43%) sont additionnés de 25 cm<sup>3</sup> d'eau, de 10 cm<sup>3</sup> de chloroforme neutre et de 1 cm<sup>3</sup> d'alcool amylique. On secoue pendant 24 heures, centrifuge pendant une heure et siphonne la couche supérieure opalescente. Cette couche est traitée 4 fois, dans les mêmes conditions, par le chloroforme et l'alcool amylique dans les mêmes proportions. Pour finir, le chloroforme ne donne plus de gel. On précipite alors par l'alcool méthylique, lave et sèche par l'alcool et l'éther. On obtient 0,25 gr. de glycogène.

*Analyses:* Teneur en protéines (dosage de l'azote selon *Dumas*): env. 0,45%.

30,155 mgr. subst. ont donné env. 0,02 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (26°; 733,5 mm.). Env. 0,07% N.

#### *Fraction III.*

Produit légèrement jaunâtre. Après une nouvelle précipitation, il reste légèrement beige, comme le glycogène commercial. Il ne forme pas de solution dans l'eau, mais une suspension, déposant très rapidement. Il se dissout dans la soude caustique et se trouble par addition d'acide acétique. La solution à 2% dans l'hydrate de chloral est très trouble. On reprécipite cette fraction en la dissolvant dans la soude caustique jusqu'à un p<sub>H</sub> de 9, on acidifie légèrement par l'acide acétique et additionne d'alcool sous forte agitation.

*Analyses:* Teneur en protéines (dosage de l'azote selon *Dumas*) env. 8%.

71,440 mgr. subst. ont donné 0,831 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (26°; 734 mm.), 1,28% N.

Teneur en glycogène: 20,0 mgr. subst. emploient 4,50 cm<sup>3</sup> de KMnO<sub>4</sub> 0,1-N: 12,9 mgr. glucose; 64% de glycogène.

*Purification de la fraction III par traitement à l'iode.*

Méthode employée par *Pucher* et *Vickery*<sup>1)</sup> pour l'amidon.

80 mgr. de glycogène de la fraction III sont traités pendant 4 heures au bain-marie par 20 cm<sup>3</sup> d'une solution de chlorure de calcium à 40%, additionnée de 0,1 gr. de carbonate de magnésium. Le p<sub>H</sub> est maintenu entre 7 et 8 par addition de carbonate de magnésium solide. On centrifuge, filtre et reprend encore deux fois le résidu de la même manière.

Le résidu d'extraction est acidifié par l'acide acétique, neutralisé par l'hydrogencarbonate de sodium et dialysé. On précipite à l'alcool et sèche: 23 mgr.

Le résidu est blanc et formé de particules insolubles dans l'eau, ne donnant pas de coloration à l'iode, et d'une petite partie soluble donnant la couleur caractéristique du glycogène avec l'iode; sa teneur en glycogène est de 60%.

Les 50 cm<sup>3</sup> d'extrait sont additionnés de 5 gr. de chlorure de sodium, acidifiés par quelques gouttes d'acide acétique et traités par 10 cm<sup>3</sup> d'une solution de triiodure de potassium à 12%. On centrifuge, lave 3 fois à l'alcool (60%) le précipité formé et le décompose par addition de quelques gouttes de solution d'hydrogénosulfite de sodium, puis on neutralise par l'hydrogencarbonate de sodium, porte à ébullition et filtre; on obtient une solution très opalescente. On dialyse pendant 3 jours contre l'eau distillée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de réaction avec le nitrate d'argent ni avec le chlorure de baryum. Le précipité inorganique formé est filtré et la solution concentrée au vide (35°/12 mm.) jusqu'à 20 cm<sup>3</sup>. On précipite par addition d'alcool jusqu'à une teneur de 60%, centrifuge, lave à l'alcool, puis à l'éther et sèche au dessiccateur: 45 mgr. C'est un produit blanc qui ne forme pas de solution dans l'eau, mais une suspension déposant très rapidement.

Centrifugation: 3,8 mgr. sont dissous dans 1,1 cm<sup>3</sup> d'eau. On centrifuge pendant une heure à 16000 tours/minute. La solution surnageante ne donne pas de coloration à l'iode. On sèche le précipité à l'alcool, puis à l'éther: 2,8 gr.

*Analyses:* Teneur en protéines (dosage de l'azote selon *Dumas*) env. 1,5%.

18,100 mgr. subst. ont donné env. 0,003 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (23°; 734 mm.); env. 0,18% N.

Teneur en glycogène: 11,2 mgr. subst. emploient 3,50 cm<sup>3</sup> KMnO<sub>4</sub> 0,1-N: 11,0 mgr. glucose; 98,5% de glycogène.

*6. Extraction du résidu à l'hydrate de chloral.*

Le résidu de l'extraction aqueuse selon 2. est séché au dessiccateur et pesé: 180 gr. On le broie avec 200 gr. de sable fin au mortier et le traite par 500 cm<sup>3</sup> d'une solution d'hydrate de chloral à 33%. On maintient une heure à 80°, en empêchant le p<sub>H</sub> de descendre au-dessous de 5 par addition d'acétate de sodium solide. On laisse refroidir et centrifuge. On recommence cette opération en laissant 3 heures en présence de l'hydrate de chloral. Le résidu dosé selon *Pflüger* ne contient pas de glycogène.

On additionne aux deux solutions réunies de l'alcool méthylique jusqu'à une concentration de 65% en agitant, laisse reposer, décante, centrifuge, lave 3 fois à l'alcool méthylique et 2 fois à l'éther, sèche au dessiccateur à vide. On obtient 4,0 gr. de produit d'une teneur en glycogène selon *Pflüger* d'environ 20%.

3 gr. du produit sont purifiés par traitement à l'iode.

Le résidu de protéines pesé après séchage à l'alcool et à l'éther est de 2,7 gr. On obtient 300 mgr. de glycogène: fraction IV.

*Analyses:* Teneur en protéines (dosage de l'azote selon *Dumas*): env. 3,5%.

29,770 mgr. subst. ont donné 0,14 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (20°; 732,5 mm.); 0,53% N.

Teneur en glycogène: 17,4 mgr. subst. emploient 5,25 cm<sup>3</sup> KMnO<sub>4</sub> 0,1-N: 16,4 mgr. glucose; 95% de glycogène.

<sup>1)</sup> *G. W. Pucher* et *H. B. Vickery*, Ind. Eng. Chem., An. Ed. **8**, 92 (1936).

### 7. Acétate de la fraction I.

2 gr. sont dissous dans 150 cm<sup>3</sup> de solution d'hydrate de chloral à 33%. On ramène le p<sub>H</sub> à 6,2 par addition d'acétate de sodium et précipite sous forte agitation par 250 cm<sup>3</sup> d'alcool fédéral; on laisse décanter, centrifuge, lave à l'alcool par centrifugation et extrait au Soxhlet pendant 2 heures à l'alcool, puis une heure à l'éther absolu. Le précipité imbibé d'éther est introduit dans un ballon de 100 cm<sup>3</sup> avec 10 cm<sup>3</sup> de pyridine anhydride et 5 cm<sup>3</sup> d'anhydride acétique et on le chauffe au bain-marie pendant 12 heures avec un réfrigérant ascendant. Après refroidissement, la solution légèrement brunâtre est versée dans 100 cm<sup>3</sup> d'alcool. On obtient une précipitation en fins flocons. On centrifuge, lave 5 fois à l'eau et 2 fois à l'alcool méthylique anhydride et sèche 24 heures dans le vide sur du chlorure de calcium et de la paraffine et 4 jours au vide poussé sur de la potasse caustique et du pentoxyde de phosphore à 45°. Rendement: 2,8 gr. d'un produit jaunâtre, soluble dans les dissolvants chlorés et l'alcool benzylique.

Teneur en groupes acétyles (selon *Bredereck*<sup>1)</sup>: 44,2% (valeur théorique du triacétate: 44,8%).

*Viscosités.*

Toutes les mesures de viscosité ont été effectuées dans le viscosimètre d'*Ostwald*, à 25,0°, en solution de tétrachloro-éthane.

c en gr./100 cm <sup>3</sup>	$\eta_{rel}$	$\eta_{spéc.}$	$\eta_{spéc./c}$
4	1,44	0,440	0,110
2	1,19	0,190	0,095
1	1,09	0,090	0,090
0	extrapolé (par voie graphique)		0,087

### 8. Acétate de la fraction II.

*Acétylation:*

4 gr. ont été acétylés de la même manière que la fraction I, mais en laissant 30 heures en présence de la pyridine et de l'anhydride acétique. La solution obtenue est de couleur brun-foncé. Le triacétate a été lavé 8 fois à l'eau et 6 fois à l'alcool méthylique absolu. On a ensuite séché 8 jours au vide poussé sur du pentoxyde de phosphore et de la potasse caustique à 45°.

Rendement: 6,0 gr. d'une poudre beige clair, soluble dans les dissolvants chlorés et l'alcool benzylique en donnant une solution brune, devenant incolore après un repos d'une dizaine de jours.

Teneur en groupes acétyles: 43,6%.

*Viscosités.*

c en gr./100 cm <sup>3</sup>	$\eta_{rel}$	$\eta_{spéc.}$	$\eta_{spéc./c}$
4	1,525	0,525	0,132
2	1,235	0,235	0,118
1	1,113	0,113	0,113
0	extrapolé (par voie graphique)		0,111

### 9. Acétate de la fraction III.

*Acétylation:*

2 gr. de la fraction III sont laissés une nuit en présence de 150 cm<sup>3</sup> d'une solution d'hydrate de chloral à 33%, puis dispersés complètement par agitation mécanique. On pré-

<sup>1)</sup> H. *Bredereck*, *Angew. Ch.* **45**, 242 (1932).

cipite et traite ensuite comme pour la fraction I, mais en présence de 30 cm<sup>3</sup> de pyridine et de 30 cm<sup>3</sup> d'anhydride acétique, pendant 30 heures, précipite et sèche.

La teneur en acétyles ne dépassant pas 33%, on a procédé à une nouvelle acétylation, en dissolvant le produit à 40° dans 50 cm<sup>3</sup> d'hydrate d'hydrazine. On précipite par 150 cm<sup>3</sup> d'alcool, lave à l'alcool par centrifugation, puis extrait au *Soxhlet* comme précédemment.

On traite par 30 cm<sup>3</sup> d'anhydride acétique et 30 cm<sup>3</sup> de pyridine anhydre 48 heures au bain-marie. La substance est ensuite précipitée et lavée comme la fraction II. On la redissout ensuite dans l'alcool benzylique et la reprécipite à l'alcool fédéral; on la lave 3 fois à l'alcool absolu et la sèche au vide poussé à 80°.

Rendement: 1,7 gr. d'une poudre brune, qui donne une solution brun-foncé dans les dissolvants chlorés et l'alcool benzylique.

Teneur en groupes acétyles: 39,8%.

*Viscosités.*

c en gr./100 cm <sup>3</sup>	$\eta_{rel}$	$\eta_{spéc.}$	$\eta_{spéc.}/c$
4	1,89	0,890	0,222
2	1,365	0,365	0,182
1	1,17	0,171	0,171
0	extrapolé (par voie graphique)		0,164

10. *Dégradation des fractions I, II et III par la  $\beta$ -amylase.*

L'enzyme est préparée selon nos indications précédentes<sup>1)</sup>.

*Activité:*

1 mgr. d'enzyme libère en 10 minutes à 35° 8 mgr. de maltose d'une solution d'amidon de *Zulkowsky* à 1%.

*Solubilisation du glycogène, teneur en enzyme et rajeunissement.*

Environ 300 mgr. de glycogène sont chauffés au bain-marie jusqu'à 60° avec 1 cm<sup>3</sup> NaOH 2-N et 5 cm<sup>3</sup> d'eau. On transvase dans un ballon jaugé de 100 cm<sup>3</sup> après refroidissement. On ajoute 35—40 mgr. d'enzyme dissous dans 25 cm<sup>3</sup> d'eau après avoir neutralisé par 2 cm<sup>3</sup> d'acide acétique 2-N, ce qui porte le p<sub>H</sub> à 4,8. On complète à 100 cm<sup>3</sup> et porte au thermostat à 35°. Les prises effectuées sont de 10 cm<sup>3</sup> et 20 cm<sup>3</sup> et la teneur en maltose est déterminée d'après *Bertrand*. La teneur en glycogène de la solution est déterminée après hydrolyse d'une demi-heure en solution de HCl 2-N en courant d'azote ou de gaz carbonique; on la vérifie en pesant exactement la substance et en en soustrayant sa teneur en humidité après séchage à poids constant, sa teneur en protéines (calculée à partir de la teneur en azote) et sa teneur en cendres.

Après un ou deux jours, il se produit en général un trouble et on «rajeunit»: 50 cm<sup>3</sup> de la solution sont additionnés de 2,5 cm<sup>3</sup> de NaOH 2-N, puis après agitation et clarification de 5 cm<sup>3</sup> d'acide acétique 2-N et de 35—40 mgr. d'enzyme dissous dans 25 cm<sup>3</sup> d'eau. On complète à 100 cm<sup>3</sup>.

Le deuxième rajeunissement est effectué par addition de 5 cm<sup>3</sup> NaOH 2-N, puis on acidifie par 10 cm<sup>3</sup> d'acide acétique 2-N et ajoute la même quantité d'enzyme que précédemment.

Pour plus de clarté, les teneurs en maltose hydraté après rajeunissement ont été rapportées à la solution de départ.

Les dégradations ont été vérifiées par une dégradation de contrôle, dont seule la valeur limite a été indiquée.

<sup>1)</sup> Helv. 23, 1465 (1940).

Après dégradation, les solutions présentent encore une légère réaction à l'iode.

Teneur en glycogène, calculée en glucose, en gr./100 cm <sup>3</sup>	Temps en heures	Prise en cm <sup>3</sup>	cm <sup>3</sup> KMnO <sub>4</sub> 0,1-N	Maltose hydraté en gr./100 cm <sup>3</sup>	% hydrolyse
<i>Fraction I</i> 0,315	12	10	1,50	0,091	29
	30	10	1,50	0,091	29
			« Rajeunissement »		
	36	20	1,85	0,112	35
	52	20	1,95	0,118	37
			« Rajeunissement »		
	100	20	1,15	0,135	42,5
Contrôle	120	20	1,20	0,138	43,5
					43
<i>Fraction II</i> 0,336	15	20	2,30	0,071	21,5
	35	20	2,30	0,071	21,5
			« Rajeunissement »		
	80	20	1,80	0,108	32
	115	20	1,75	0,106	31,5
			« Rajeunissement »		
	160	20	0,925	0,112	33
Contrôle	200	20	0,95	0,115	34
					36
<i>Fraction III</i> 0,295	48	10	0,775	0,045	15
	150	10	1,10	0,065	22
			« Rajeunissement »		
	170	20	1,15	0,067	23
	210	20	1,325	0,077	26,5
			« Rajeunissement »		
	300	20	0,725	0,090	30,5
Contrôle	325	20	0,70	0,088	30
					32
Glycogène commercial de foie de bœuf « Hoffmann-La Roche » 0,326	18	10	1,85	0,111	33
	42	10	2,05	0,123	38
			« Rajeunissement »		
	70	20	2,475	0,148	46,5
	105	20	2,40	0,145	45,5
Contrôle	130	20	2,50	0,150	47
					46

### 11. Dextrine par l'acide chlorhydrique.

800 mgr. de glycogène de la fraction II sont dissous dans 8 cm<sup>3</sup> d'eau et portés à 100° au bain-marie. On additionne de 8 cm<sup>3</sup> de HCl 2-N portés préalablement à l'ébullition et laisse 2 minutes à 100°. On arrête alors la dégradation en versant dans 50 cm<sup>3</sup> d'alcool méthylique. Le précipité obtenu est formé de grumeaux gluants. On centrifuge et lave par centrifugation une fois à l'alcool méthylique à 60%, 3 fois à l'alcool méthylique

absolu et 2 fois à l'éther; la substance devient alors cassante; on sèche au dessiccateur à vide.

Rendement: 550 mgr. d'une poudre blanc neigeux, donnant une solution limpide dans l'eau, avec réaction nette à l'iode. Pouvoir réducteur de la solution: nul.

12. *Glycogène traité à l'alcali en présence d'oxygène.*

1,22 gr. de glycogène de la fraction II sont introduits dans un creuset de platine avec 15 cm<sup>3</sup> de potasse caustique à 60%. On chauffe au bain-marie à l'air libre pendant 2 heures. On transvase, lave le creuset avec 30 cm<sup>3</sup> d'eau et précipite par addition de 100 cm<sup>3</sup> d'alcool méthylique. On centrifuge, lave avec un mélange de 40 cm<sup>3</sup> de potasse caustique à 15% et 80 cm<sup>3</sup> d'alcool méthylique, puis avec l'alcool méthylique à 60% et enfin avec l'alcool méthylique absolu. Le résidu est ensuite dissous dans 100 cm<sup>3</sup> d'eau froide, centrifugé et filtré, puis précipité par 150 cm<sup>3</sup> d'alcool méthylique, lavé à l'alcool et à l'éther et séché au dessiccateur à vide.

Rendement: 1,10 gr. d'une poudre moins blanche que le produit de départ.

La solution à 1% est fortement opalescente et identique à celle du produit de départ.

13. *Glycogène traité à l'alcali en absence d'oxygène.*

0,75 gr. de glycogène sont chauffés deux heures au bain-marie dans un courant d'azote avec 10 cm<sup>3</sup> de potasse caustique à 60% débarrassée de l'oxygène par ébullition préalable en courant d'azote. La chauffe se fait dans un creuset de platine au fond d'une éprouvette parcourue par le courant d'azote. La suite des opérations a lieu comme précédemment.

Rendement: 0,715 gr. d'un produit possédant les mêmes réactions que celui obtenu en présence d'oxygène.

*Dégradations par la β-amylase.*

Teneur en glycogène, calculée en glucose, en gr./100 cm <sup>3</sup>	Temps en heures	Prise en cm <sup>3</sup>	cm <sup>3</sup> KMnO <sub>4</sub> 0,1-N	Maltose hydraté en gr./100 cm <sup>3</sup>	% hydrolyse
Dextrine par l'acide chlorhydrique 0,315	36	10	1,65	0,098	31
	72	10	2,10	0,126	40
	100	10	2,25	0,135	43
			« Rajeunissement »		
	175	10	1,40	0,169	53,5
Contrôle	250	10	1,375	0,165	53
					53
Glycogène traité par KOH en présence de O <sub>2</sub> 0,325	48	10	1,30	0,078	24
	162	10	1,60	0,098	30
	200	10	1,80	0,110	34
			« Rajeunissement »		
	450	10	0,95	0,115	35
Contrôle					33
					33
Glycogène traité par KOH en absence de O <sub>2</sub> 0,310	62	10	1,25	0,076	24
			« Rajeunissement »		
	165	20	1,50	0,093	30
			« Rajeunissement »		
	280	20	0,80	0,099	32
Contrôle					32
					32

14. *Mesures osmotiques des triacétates des fractions I et II.*

Les mesures sont effectuées dans la cellule de *Herzog* et *Spurlin*.

Les triacétates ont été séchés 8 jours à 80° sur du pentoxyde de phosphore, à 0,01 mm. Les mesures ont été effectuées à 25°, en solution dans l'alcool benzylique.

Les valeurs de la pression osmotique sont corrigées pour la tension superficielle.

Fraction	Concentration en gr./100 cm <sup>3</sup>	Volume spéc. à 25°	Pression osm. en mm H <sub>2</sub> O de 4°	M apparent	$\pi/c$
I	8,96	0,94325	3,7	$6,1 \times 10^6$	0,0044
II	9,85	0,93835	12,2	$2,1 \times 10^6$	0,0124
II	5,27	0,94805	4,45	$3,0 \times 10^6$	0,0084

Pour les valeurs de  $\pi/c$ ,  $\pi$  est exprimé en atm.  $\times 10^2$  et c en gr./100 cm<sup>3</sup>.

Ces données ne permettent pas une extrapolation de  $\pi/c$  à la concentration  $c = 0$ , extrapolation nécessaire pour calculer le poids moléculaire.

Les valeurs indiquées sous M apparent ne sont donc que des limites inférieures; le poids moléculaire réel doit être encore plus élevé. D'autre part, le fait que la fraction I la plus pure, mais la plus facilement soluble et la moins visqueuse, conduit à un poids moléculaire apparent plus élevé que la fraction II, montre que le poids moléculaire apparent trouvé pour cette dernière est dû bien plus aux impuretés à poids moléculaire relativement bas qu'au glycogène lui-même. Ceci constitue une autre raison pour laquelle on ne peut attribuer aux valeurs trouvées qu'une signification de limite inférieure.

15. *Extraction du glycogène selon Pflüger.*

30 gr. de chair d'anodontes sont traités par 35 cm<sup>3</sup> d'eau et 50 gr. de potasse caustique solide dans une capsule en platine pendant 5 heures au bain-marie dans un courant d'azote. On additionne après refroidissement de 75 cm<sup>3</sup> d'eau et de 150 cm<sup>3</sup> d'alcool méthylique à 98% sous forte agitation. On centrifuge, lave deux fois avec 100 cm<sup>3</sup> d'une solution composée de  $\frac{2}{3}$  d'alcool méthylique 98% et  $\frac{1}{3}$  de potasse caustique à 15%. On filtre sur papier et redissout avec 250 cm<sup>3</sup> d'eau. Par addition de 370 cm<sup>3</sup> d'alcool méthylique, on obtient un produit brun-rougâtre. Ce dernier est traité une deuxième fois par la potasse caustique. Après précipitation et centrifugation, on lave avec l'alcool méthylique à 70%, puis à 98% et 3 fois à l'éther. On sèche au dessiccateur à vide. On obtient 500 mgr. d'une poudre beige.

*Comportement à l'électrodialyse.*

220 mgr. de ce glycogène, dissous dans 30 cm<sup>3</sup> d'eau distillée, sont introduits dans l'électrodialyseur. Au bout de 5 jours, le courant était tombé à 0,7 mA sous une tension de 80 volts; la couche supérieure est alors siphonnée. On obtient 23 cm<sup>3</sup> d'une solution limpide contenant 37 mgr. de glycogène. Le dépôt (avec 10 cm<sup>3</sup> de la solution limpide) contient 180 mgr. de glycogène. Le glycogène de moule extrait selon *Pflüger* contient donc environ 55 mgr. de glycogène soluble (25%) et environ 162 mgr. de glycogène insoluble (75%).

Laboratoire de Chimie inorganique et organique  
de l'Université de Genève.